

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

Rec'd PCT/PTO

07 MAR 2005

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international(43) Date de la publication internationale
18 mars 2004 (18.03.2004)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2004/022769 A2(51) Classification internationale des brevets⁷ :**C12Q**

(74) Mandataires : PEAUCELLE, Chantal etc.; Cabinet AR-MENGAUD AINE, 3, Avenue Bugeaud, F-75116 PARIS (FR).

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR2003/002667(22) Date de dépôt international :
8 septembre 2003 (08.09.2003)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
02 11 100 6 septembre 2002 (06.09.2002) FR(71) Déposant (*pour tous les États désignés sauf US*) : INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE (I.N.S.E.R.M.) [FR/FR]; 101, rue de Tolbiac, F-75654 PARIS CEDEX 13 (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (*pour US seulement*) : DELACOURTE, André [FR/FR]; 75, rue Gambetta, F-59155 FACHES-THUMESNIL (FR). SERGEANT, Nicolas [FR/FR]; 9, Avenue Jean Jaurès, F-59790 RONCHIN (FR). WATTEZ, Annick [FR/FR]; 5, Avenue du Quen-nelet, F-59493 VILLENEUVE D'ASCQ (FR).(81) États désignés (*national*) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.(84) États désignés (*régional*) : brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée :

— sans rapport de recherche internationale, sera republiée dès réception de ce rapport

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.

WO 2004/022769 A2

(54) Title: MEANS OF DETECTING NEURODEGENERATIVE PROCESSES AND APPLICATIONS OF SAME

(54) Titre : MOYENS DE DETECTION DES PROCESSUS NEURODEGENERATIFS ET LEURS APPLICATIONS

(57) Abstract: The invention relates to novel markers of the neurodegenerative process, comprising the α chain of the modified ATP synthase. The invention also relates to methods of detection, diagnosis, antibodies, kits and applications of same.(57) Abrégé : La présente invention se rapporte à de nouveaux marqueurs du processus neurodégénératif, constitués par la chaîne α de l'ATP synthase ayant subi des modifications. L'invention vise également des méthodes de détection, de diagnostic, des anticorps, des kits et leurs applications.

Moyens de détection des processus neurodégénératifs
et leurs applications.

L'invention a pour objet des moyens de détection des processus neurodégénératifs et leurs applications.

Elle vise plus particulièrement de nouveaux marqueurs du processus neurodégénératif, des méthodes de détection et de diagnostic, ainsi que leurs applications thérapeutiques et diagnostiques.

La maladie d'Alzheimer (MA) est une maladie neurodégénérative qui conduit à la perte des fonctions intellectuelles et donc à l'installation progressive et irréversible d'une démence. L'avenir de cette maladie s'annonce redoutable avec le vieillissement de la population car le facteur de risque majeur est l'âge.

99 % des formes observées sont non-familiales. Pour les formes familiales, les mutations pathologiques sont observées sur le gène APP du chromosome 21, et sur les gènes PS1 et PS2 (présénilines 1 et 2) qui se trouvent sur les chromosomes 14 et 1.

Deux processus dégénératifs caractérisent la maladie d'Alzheimer. L'amyloïdogénèse, qui résulte d'un dysfonctionnement de la protéine APP, et la dégénérescence neurofibrillaire (DNF), qui correspond à l'accumulation de protéine tau dans les cellules nerveuses.

Le dysfonctionnement de la protéine APP est à l'origine même de la pathologie Alzheimérienne, mais c'est l'extension de la dégénérescence neurofibrillaire dans les territoires cérébraux qui est la mieux corrélée avec l'expression des manifestations cliniques. 10 stades d'invasion de la dégénérescence neurofibrillaire ont été déterminés. La relation entre les dépôts amyloïdes et la dégénérescence neurofibrillaire est encore peu connue, mais il y a

certainement potentialisation de la pathologie tau par le dysfonctionnement de la protéine APP.

De nombreuses hypothèses ont été formulées pour expliquer la dégénérescence et la mort neuronale. Il semble indéniable que de nombreux facteurs interviennent, dont la perte de fonction de la protéine APP, la neurotoxicité du peptide amyloïde, l'âge, les phénomènes de réparation neuronale, modulés par l'apolipoprotéine E, la co-morbidité, les réactions immunologiques et inflammatoires, ainsi que le stress oxydatif.

De nombreux travaux suggèrent que l'oxydation pourrait contribuer soit directement, soit indirectement à la mort neuronale dans la maladie d'Alzheimer. Cependant, il n'y a pas d'argumentation moléculaire directe pour justifier cette hypothèse.

L'invention est basée sur la démonstration d'un mécanisme délétère qui s'associe au processus de dégénérescence neurofibrillaire observé au cours de la maladie d'Alzheimer et des pathologies apparentées.

En particulier, elle porte sur la démonstration directe de la participation d'une molécule de la chaîne respiratoire de la mitochondrie et en particulier d'une protéine du complexe V de cette chaîne respiratoire. Il s'agit d'une localisation particulière de la protéine et d'une insolubilisation de la chaîne α de l'ATP synthase qui s'accumule alors dans les neurones en dégénérescence et s'associe étroitement à la protéine tau ou à ses polymères (filaments pathologiques de la dégénérescence neurofibrillaire) observés en particulier dans la maladie d'Alzheimer.

Les recherches menées par les inventeurs les ont amené à mettre au point un anticorps monoclonal, nommé AD46, qui détecte les filaments pathologiques qui s'accumulent dans les neurones en dégénérescence au cours de la maladie d'Alzheimer. Cet anticorps reconnaît les amas fibrillaires pathologiques de

la DNF à l'échelle de la microscopie optique et les PHF (paires de filaments en hélice) à l'échelle de la microscopie électronique (Figures 1 et 2). L'immunomarquage est colocalisé avec les protéines tau agrégées, qui sont les constituants de base de la DNF. Cependant, le marquage AD46 précède parfois l'immunomarquage tau de la dégénérescence neurofibrillaire, révélé par des anticorps anti-tau phospho-dépendants et phospho-indépendants. Le marquage de l'anticorps AD46 étant indépendant du marquage tau, il démontre l'existence d'un troisième processus agrégatif dont le composant essentiel est la chaîne α de l'ATP synthase humaine. Le marquage avec l'anticorps AD46 intervenant parfois avant le marquage des protéines tau démontre également qu'il s'agit d'un marqueur précoce du processus neurodégénératif.

La technique d'immunoempreinte mono et bidimensionnelle révèle que l'anticorps AD46 reconnaît une protéine majeure et deux protéines mineures dans un homogénat de tissu cérébral humain (Figure 3). Ces trois protéines sont différentes des protéines tau et des produits de catabolisme des protéines tau. En effet, AD46 ne reconnaît pas les protéines tau normales et pathologiques, extraites d'homogénats de tissu cérébral de patients Alzheimer et de témoins, pas plus que les protéines tau recombinantes.

L'analyse bidimensionnelle et l'approche protéomique ont permis d'identifier la protéine majeure et les deux protéines mineures détectées par AD46. Les masses moléculaires sont de 42, 47 et 55 kDa (Figure 3). Après électrophorèse 2D, les points isoélectriques respectifs de chaque polypeptide sont de 5,0, 5,8, 7,0 et 8,2 (Figure 3). La caractérisation par spectrométrie de masse démontre que les polypeptides à 42 et 47 kDa correspondent respectivement à l'actine cytoplasmique, la gamma-énolase et l'alpha-énolase. L'antigène majeur à 55kDa et de pI 8,2 correspond à la chaîne α de l'ATP synthase (Figures 4 et 5). Ce résultat pour la chaîne α est confirmé

par l'utilisation d'un anticorps polyclonal dirigé contre cette protéine (Figure 6).

La chaîne α de l'ATP synthase est bien un nouveau constituant de la DNF, dans la mesure où un anticorps polyclonal dirigé contre la chaîne α de l'ATP synthase recombinante reconnaît bien les neurones humains en DNF (Figure 8), à l'échelle de la microscopie optique et électronique.

La chaîne α de l'ATP synthase n'est pas associée indirectement et secondairement à la DNF, mais liée directement au processus dégénératif. En effet, l'étude de la distribution de la chaîne α de l'ATP synthase dans les différentes fractions protéiques de tissu cérébral de témoins et de patients Alzheimer démontre que la disparition de la chaîne α de l'ATP synthase intervient progressivement au cours de l'installation du processus de DNF (Figures 6 et 7). Alors que la chaîne α de l'ATP synthase (Figures 6 et 7, composante A) détectée par l'anticorps monoclonal AD46 est observée essentiellement dans les fractions Triton 0,5 % et 2 % d'homogénats cérébraux de témoins, elle est absente de la fraction Triton 0,5 % d'homogénats cérébraux de patients Alzheimer au stade infraclinique et absente des fractions 0,5 % et 2% Triton des fractions protéiques d'homogénats de patients Alzheimer (Figure 6). De la même manière, l'utilisation de l'anticorps polyclonal dirigé contre la chaîne α de l'ATP synthase montre également un déplacement de la solubilité de cette protéine dans des fractions plus insolubles (fractions SDS 0,1 et 1%, Figure 7). L'insolubilisation de la chaîne α de l'ATP synthase suit l'agrégation des protéines tau, comme le montrent les co-marquages la chaîne α de l'ATP synthase / tau (Figure 7). Cette disparition de la chaîne α de l'ATP synthase est observée spécifiquement dans les régions cérébrales affectées

par la dégénérescence neurofibrillaire de patients au stade infraclinique (stades 4 à 7 de Delacourte et al., 1999) (Figure 6). Elle est observée dans toutes les régions cérébrales des patients à un stade avancé de la maladie (stades 8 à 10 de Delacourte et al., 1999) (Figures 6 et 7). De plus, il y a co-immunoprecipitation des protéines tau agrégées et la chaîne α de l'ATP synthase et vice-versa, démontrant l'implication directe de la chaîne α de l'ATP synthase dans le processus agrégatif des protéines tau (Figure 8). La purification des protéines tau agrégées permet également de co-purifier la chaîne α de l'ATP synthase (Figure 8).

La fonction biologique de la chaîne α de l'ATP synthase indique que le processus de dégénérescence neurofibrillaire au cours de la maladie d'Alzheimer est lié, au moins en partie, à une localisation singulière et une accumulation de la protéine dans le cytoplasme des neurones en dégénérescence neurofibrillaire. Indirectement, la localisation de la chaîne α de l'ATP synthase pourrait altérer le processus d'oxydo-phosphorylation de la chaîne respiratoire de la mitochondrie, ou initier un processus de dégénérescence.

La chaîne α de l'ATP synthase est également associée à d'autres fonctions biologiques. Il pourrait s'agir d'un récepteur membranaire pour des cytokines, telle que l'angiostatine ou le polypeptide II activateur des cellules endothéliales et des monocytes. Elle est également décrite dans plusieurs compartiments cellulaires, telle que la membrane plasmique, les peroxisomes. Il pourrait également s'agir d'une protéine chaperonne. L'association de la chaîne α de l'ATP synthase aux agrégats de protéines tau pourrait altérer une ou plusieurs des fonctions biologiques de la chaîne α de l'ATP synthase.

L'invention vise donc de nouveaux marqueurs du processus neurodégénératif, constitués par la chaîne α de l'ATP synthase ayant subi des modifications pathologiques résultant dudit processus.

Elle vise plus particulièrement l'utilisation de la chaîne α de l'ATP synthase ayant subi des modifications pathologiques résultant d'un processus neurodégénératif comme marqueur des maladies neurodégénératives, dont les tauopathies.

En particulier, ces marqueurs sont caractérisés en ce que les modifications de la chaîne α de l'ATP synthase sont de type fonctionnels, de localisation, structurels et/ou antigéniques. Ces marqueurs sont particulièrement adaptés pour la détection du processus neurodégénératif de toute pathologie avec un processus de dégénérescence neurofibrillaire et d'agrégation de la protéine tau, plus particulièrement, le processus neurodégénératif de la maladie d'Alzheimer.

Les modifications fonctionnelles, de localisation, structurelles de la chaîne α de l'ATP synthase présentées par les marqueurs selon l'invention peuvent être en particulier, respectivement, son insolubilité, sa localisation dans le cytoplasme de la cellule et/ou la formation d'agrégats au niveau du cerveau. Ces modifications peuvent être également de type conformationnel et/ou post-traductionnel, y compris de maturation.

Par « localisation dans le cytoplasme », on exclut en particulier la localisation intra-ribosomale.

La formation d'agrégat concerne la chaîne alpha de l'ATP synthase seule, ou en interaction avec les protéines tau, pour induire la tauopathie, c'est-à-dire l'agrégation des protéines tau.

La découverte de ces nouveaux marqueurs, liés directement au processus dégénératif de la maladie d'Alzheimer, ouvre des perspectives diagnostiques et thérapeutiques de grand intérêt.

L'invention vise donc également une méthode de détection et/ou de diagnostic in vitro du processus neurodégénératif, caractérisée en ce qu'on détecte dans un échantillon à analyser un des marqueurs selon l'invention. La méthode comprend avantageusement l'utilisation de jeux d'anticorps dirigés contre la protéine normale et/ou contre des modifications de la chaîne α de l'ATP synthase.

La méthode selon l'invention est particulièrement adaptée à la détection du processus dégénératif de la maladie d'Alzheimer.

Les techniques utilisées dans une telle méthode sont variées : détection immuno-chimique, en particulier par électrophorèse 1D et/ou 2D couplée à une immunoempreinte, révélation par des anticorps polyclonaux ou des anticorps monoclonaux dirigés contre la chaîne α de l'ATP synthase, immuno-essai et/ou radioimmuno-essai.

La capture de la chaîne alpha de l'ATP synthase pathologique pourra être suivie par une analyse complémentaire par spectrométrie de masse : on effectue alors une immunocapture de la chaîne alpha de l'ATP synthase pathologique et on analyse les produits capturés par spectrométrie de masse.

Inversement, et en complément, il est possible de réaliser l'immunocapture des protéines tau pathologiques puis de rechercher et d'identifier tout ou partie de la chaîne alpha de l'ATP synthase pathologique associée aux protéines tau, par spectrométrie de masse.

Tout type d'échantillons à analyser peuvent être utilisés : tissus ou des cellules neuronales, tissus ou des cellules non neuronales, en particulier des liquides biologiques, de préférence le sang.

La méthode de diagnostic selon l'invention peut comporter en outre un étape d'évaluation du degré de la pathologie en établissant un indice basé sur le rapport entre le taux normal

de chaînes α de l'ATP synthase chez des témoins dans une fraction protéique définie, par rapport au taux observé au stade avancé de la maladie d'Alzheimer.

De manière alternative, le degré de la pathologie peut être évalué en établissant un indice basé sur les modifications de la chaîne α de l'ATP synthase chez un patient par rapport à un témoin.

La détection de modifications fonctionnelles et/ou de localisation et/ou structurales et/ou antigéniques de la chaîne α de l'ATP synthase dans les liquides biologiques périphériques et/ou dans le tissu cérébral et/ou dans des tissus périphériques permet de réaliser un test diagnostique précoce. En particulier, la mort neuronale qui survient au cours de la maladie d'Alzheimer provoque une libération de protéines tau dans le liquide céphalorachidien (LCR). La présence de la chaîne α de l'ATP synthase dans les liquides biologiques, dont l'association aux protéines tau a été démontrée, peut donc compléter le diagnostic biologique d'une manière avantageuse. L'invention permet une approche diagnostique nouvelle des pathologies neurodégénératives, en particulier de la maladie d'Alzheimer. La chaîne α de l'ATP synthase étant observée précocement, parfois avant l'agrégation des protéines tau, sa détection dans les liquides biologiques, et en particulier le LCR, est un marqueur de choix, utilisable à des fins de diagnostic précoce ou de détermination de facteur de risque.

L'invention propose également une méthode d'évaluation de l'interaction pathologique de la chaîne α de l'ATP synthase avec les protéines tau, et réciproquement, utilisant des techniques appropriées comme par exemple le bio-sensor, l'ELISA, les immunoprécipitations, la spectrométrie de masse. Cette méthode permet de définir un indice de transformation pathologique de la chaîne α de l'ATP synthase et/ou de la

protéine tau. Elle vise également les kits pour la mise en œuvre de ladite méthode d'évaluation.

Les méthodes de détection, de diagnostic ou d'évaluation selon l'invention peuvent avantageusement être utilisées pour établir un diagnostic *ante et post-mortem* des maladies neurodégénératives, en particulier de la maladie d'Alzheimer, du stade infraclinique (« *mild cognitive impairment* ») au stade clinique, pour réaliser un criblage pharmacologique et des essais thérapeutiques de molécules efficaces contre les pathologies neurodégénératives, en particulier de type tauopathie ou maladie d'Alzheimer, et/ou pour établir et valider des modèles cellulaires et/ou des modèles animaux de pathologies neurodégénératives, en particulier de type tauopathie ou maladie d'Alzheimer.

L'invention couvre également tout modèle animal ou cellulaire, caractérisé en ce qu'il exprime une chaîne α de l'ATP synthase présentant un défaut de signal de maturation ou une modification post-traductionnelle liée au processus dégénératif.

Il s'agit, par exemple, de modèles (animaux ou cellulaires) exprimant la chaîne α de l'ATP synthase dans le cytoplasme de cellules, c'est-à-dire en éliminant les 47 premiers acides aminés qui constituent le signal de maturation de la chaîne α de l'ATP synthase pour son intégration au complexe V de la chaîne respiratoire de la mitochondrie. Ces modèles devraient ainsi reproduire l'accumulation de la chaîne α de l'ATP synthase dans le cytoplasme.

Il s'agit en particulier de rechercher la délocalisation de la chaîne α de l'ATP synthase dans un système reconstitué, appelé « *cybrid* » (Sheehan et al., 1997). Ce système consiste à évaluer le fonctionnement des mitochondries obtenues des plaquettes sanguines de patients atteints de la maladie d'Alzheimer dans un système cellulaire reconstitué.

L'adressage de la chaîne α de l'ATP synthase dans ce système peut être évalué et un index d'adressage défini (la valeur 100 correspondant à des sujets normaux, la valeur 0 à des patients atteints de la maladie d'Alzheimer).

L'invention vise également l'application thérapeutique, dans la mesure où la chaîne α de l'ATP synthase est une cible pharmacologique précise, qui peut être modulée par action d'inhibiteurs et d'activateurs spécifiques, de la protéine elle-même et/ou de ses ligands, et/ou du complexe V de la chaîne respiratoire de la mitochondrie en général. En effet, son action porte directement sur le processus de dégénérescence neurofibrillaire, et peut également porter sur le métabolisme de l'APP.

L'utilisation d'un kit de détection de la chaîne α de l'ATP synthase, pour le diagnostic de maladie neurodégénératives, en particulier pour la détection de la maladie d'Alzheimer, entre également dans le champ de l'invention.

L'invention propose enfin un kit de diagnostic comprenant des jeux d'anticorps polyclonaux et/ou monoclonaux dirigés contre des motifs de conformation pathologique de la chaîne α de l'ATP synthase résultant d'un processus neurodégénératif. Elle couvre également lesdits anticorps. De manière avantageuse, ledit kit renferme des réactifs permettant la réalisation d'un dosage immunochimique, en particulier de type ELISA, immuno-empreintes, Western blots, dots-blots, radioimmuno-essai ou immuno-essai. Un dosage complémentaire par spectrométrie de masse est également possible, afin de détecter sans ambiguïté les altérations de la chaîne alpha de l'ATP synthase pathologique.

L'exemple 3 ci-après propose également une méthode de préparation d'outils immunologiques contre la chaîne alpha de l'ATP synthase comportant les étapes suivantes :

- extraction sélective de la dégénérescence neurofibrillaire à partir de tissu humain affecté d'un processus neurodégénératif,
- extraction de la chaîne α de l'ATP synthase pathologique,
- utilisation de la chaîne α de l'ATP synthase purifiée comme antigène pour la production d'anticorps polyclonaux.

Pour la production d'anticorps monoclonaux, les clones retenus possèdent de préférence les propriétés immunologiques suivantes:

- Détection des processus neurodégénératifs de type Alzheimer par immunohistochimie
- Détection de la chaîne alpha de l'ATP synthase pathologique
- Co-immunoprécipitation des protéines tau pathologiques

D'autres caractéristiques et avantages de l'invention apparaîtront dans les exemples qui suivent, avec références aux figures 1 à 11 :

- les figures 1 et 2 illustrent l'immunodétection de la dégénérescence neurofibrillaire de type Alzheimer par l'anticorps AD46, à l'échelle de la microscopie optique et électronique.
- les figures 3, 4 et 5 sont relatives à la caractérisation des protéines détectées par AD46, par électrophorèse monodimensionnelle (fig. 3 ; 1D), puis par électrophorèse bi-dimensionnelle (fig. 3 ; 2D), par analyse par spectrométrie de masse du spot détecté par AD46 (fig. 4), et enfin par comparaison en gel 2D de

l'immunodétection de AD46 par rapport à un anticorps dirigé contre la protéine identifiée, à savoir de la chaîne α de l'ATP synthase (fig. 5).

- les figures 6 et 7 montrent l'insolubilisation de la chaîne α de l'ATP synthase ; celle-ci disparaît des fractions Triton au cours de l'Alzheimérisation.
- la figure 8 illustre l'interaction de la chaîne α de l'ATP synthase avec la protéine tau ; elle est extraite et immuno-précipitée avec la protéine tau.
- La figure 9 illustre un immunomarquage similaire de la dégénérescence neurofibrillaire, sur coupe de tissu Alzheimer, avec un anticorps anti-tau (AD2), AD46, et un anti-chaîne α de l'ATP synthase.
- Les figures 10 et 11 sont relatives à la spécificité de la détection de la dégénérescence neurofibrillaire.

Exemple 1 : Mise en évidence de l'implication de la chaîne α de l'ATP synthase dans la maladie d'Alzheimer (MA).

A. Matériel et méthodes

Anticorps monoclonal AD46

L'anticorps monoclonal AD46 a été obtenu à l'aide d'un kit d'immunisation *in vitro* (Immune System, Bristol, UK) à partir de la substance la plus insoluble en acide formique du tissu cérébral d'un patient atteint de la maladie d'Alzheimer. L'immunogène a été préparé suivant la méthode décrite par Permanne et al., 1995. Le kit d'immunisation *in vitro* a été utilisé suivant les recommandations du constructeur. La sélection du clone a été réalisée par immunohistochimie sur des coupes de tissu cérébral de patients atteints de la maladie d'Alzheimer.

Immunohistochimie et microscopie électronique

L'immunohistochimie est réalisée à partir de tissu cérébral humain fixé et congelé. Les coupes de $15\mu\text{m}$ sont laissées à décongeler pendant 15 min. L'activité peroxydase endogène est neutralisée par un traitement à l'eau oxygénée (solution à 1 %) suivi de plusieurs rinçages dans l'eau. Les coupes sont ensuite équilibrées dans le tampon d'incubation de l'anticorps (PBS, Sigma). L'anticorps est utilisé à une dilution finale de 1/1000 dans le PBS et l'incubation sur la coupe est effectuée 2 heures à température ambiante. Après plusieurs rinçages dans le tampon d'incubation, la coupe est incubée avec l'anticorps secondaire couplé à la peroxydase (Horseraddich peroxidase conjugate anti-mouse antibodies, Sigma). Les complexes sont révélés avec un kit de révélation (FastDAB, Sigma) suivant les instructions du constructeur. Le protocole de microscopie électronique est identique à celui décrit par Reig et al., 1995.

Préparation des échantillons de tissu cérébral humain

Les échantillons de tissu cérébral, obtenus après autopsie ou biopsie et conservés à -80°C , ont été disséqués en se référant à un atlas anatomique, puis homogénéisés à l'aide d'un potter en Téflon® dans 10 volumes de tampon de lyse 1-D (50 mM Tris-HCl pH 6,8 ; 4mM EDTA ; 5 % (p/v) de SDS, 10 % (v/v) de glycérol, 2 % (v/v) de β -mercaptoéthanol et 0,05 % Bleu de Bromophénol). Les échantillons ont été portés à 100°C pendant 10 minutes et conservés à -80°C jusqu'à leur utilisation.

Fractionnement des protéines du tissu cérébral humain

Les échantillons de tissu cérébral ont été homogénéisés selon un ratio 1/10 (p/v) dans du tampon Tris 10 mM pH 6,8 puis centrifugés à 100 000 g pendant 1 heure à 4°C . Le surnageant (S1) a été conservé et le culot homogénéisé à nouveau dans le

même tampon complémenté avec 0,5 % de Triton X-100. Une étape supplémentaire de centrifugation a été effectuée dans les mêmes conditions. Au total, six centrifugations ont ainsi été réalisées après addition successive de 2 % de Triton X-100, 0,5 % de SDS, 1 % SDS et 2 % SDS.

Selon la technique biochimique utilisée, sont ajoutés aux surnageants, au moment de l'utilisation, les tampons correspondants : 1 volume de tampon de lyse 1-D (100 mM Tris-HCl pH 6,8 ; 8mM EDTA ; 10 % (p/v) de SDS ; 20 % (v/v) de glycérol ; 4 % (v/v) de β -mercaptopéthanol et 0,1 % Bleu de Bromophénol) pour une étude par électrophorèse monodimensionnelle ou 1 volume de tampon de lyse 2-D (7M urée ; 2M thiourée ; 4 % Pharmalytes® 3-10 (p/v) ; 4% (v/v) Triton X-100 ; 20 mM de dithiothréitol) pour une étude par électrophorèse bidimensionnelle.

Purification des agrégats de protéines tau des neurones en dégénérescence

Le mode expérimental utilisé est celui décrit par Greenberg et Davies, 1990 et modifié par Goedert et al., 1992. Le tissu cérébral est homogénéisé à l'aide d'un Potter en Téflon dans une solution contenant 10 mM Tris-HCl pH 7.4, 800 mM NaCl, 1mM EGTA et 10% de sucrose. L'homogénat est centrifugé à 20 000g pendant 30 minutes à 4°C. Le surnageant est récupéré, le culot est homogénéisé à nouveau suivant le même protocole. Après centrifugation suivant les mêmes paramètres précédemment cités, le surnageant est récupéré et mélangé au premier. L'homogénat est additionné de N-lauryl sarcosine à une concentration finale de 1% et il est placé en agitation douce pendant 1 heure à température ambiante. Après centrifugation à 100 000g pendant 1 heure, le culot contenant les agrégats de protéines tau est traité par 1 volume de tampon de lyse 1-D.

Immunoprecipitation

Le tissu cérébral est homogénéisé à l'aide d'un potter en verre fritté dans 10 volumes d'une solution contenant 10 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 M NaCl. L'homogénat est centrifugé à 27 000g pendant 30 minutes à 4°C suivant la procédure décrite par Vincent et Davies (1992). Le surnageant est mélangé avec 10 µl de protéine A/G agarose. L'homogénat est centrifugé à 2000g pendant 10 min à 4°C. Le surnageant est additionné de 10 µl d'anticorps anti chaîne α de l'ATP synthase, ou 5µl de l'anticorps AD46 ou 5µl de l'anticorps AD2 et il est agité pendant la nuit à 4°C. 10 µl de protéine A/G agarose sont ajouté à l'homogénat et l'ensemble est en agitation pendant 30 min à 4°C. Une série de 3 lavages est effectuée. L'homogénat est centrifugé à 2000g pendant 10 minutes à 4°C, 100 µl de tampon de départ sont ajoutés, l'ensemble est agité pendant 5 min à température ambiante et centrifugé à nouveau. L'étape est répétée deux fois. Les billes sont ensuite incubées avec 10 volumes de tampon de lyse 1-D et placées à 60°C pendant 5 min. Le surnageant est utilisé pour les étapes ultérieures d'analyse.

Électrophorèse 1-D ou SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)

Les expériences ont été réalisées à l'aide du système Protean Xi Cell (Biorad) selon les instructions du fabricant. Les SDS-PAGE ont été réalisés selon les protocoles décrits par Laemmli (1970) pour la fabrication du gel. Il s'agit de gel en gradient de polyacrylamide compris entre 8 et 15%. 100 µg de protéines sont déposées dans chaque couloir.

Électrophorèse 2-D1^e dimension

La première dimension est effectuée suivant le protocole décrit par O'Farrell et al., 1977. Le matériel utilisé pour

l'isoélectrofocalisation est le système IEF Protean Cell (Biorad) selon les instructions du constructeur. Le gel contient 9,5 M d'urée, 4 % de Triton X-100 et 4 % de Pharmalytes 3-10. La polymérisation est amorcée par l'addition de persulfate d'ammonium et de TEMED. Le gel est coulé dans des tubes de 20 cm et 2 mm de diamètre interne. 50 µl d'homogénat 2D sont déposés au côté anode du gel et l'isoélectrofocalisation est effectuée par l'application d'une tension de 400 volts pendant 6 heures.

2^e dimension

Avant utilisation, les gels sont équilibrés pendant 30 minutes dans un tampon SDS-PAGE (50 mM Tris pH 6,8 ; 10 % de glycérol ; 2 % de β-mercaptoproéthanol ; 2 % de SDS ; 0,05 % bleu de bromophénol) puis déposés sur le haut d'un gel de séparation de SDS-PAGE en gradient de polyacrylamide 8-15 %.

Transfert sur membrane de nitrocellulose et Immunoempreinte

Le transfert a été effectué en utilisant le système de transfert semi-sec Pharmacia LKB multiphor® en suivant les instructions du fabricant (Amersham-Pharmacia Biotech). Les protéines ont été transférées à 0,8 mA/cm² sur une membrane de nitrocellulose Hybond® ECL (Pharmacia-Amersham).

La membrane est incubée 60 minutes dans solution contenant 15 mM de Tris pH 8,0, 150 mM NaCl, 0,5 % de Tween®-20 et 5 % de lait écrémé puis lavée avec le même tampon exempt de lait et contenant 0,1 % de Tween-20 au lieu de 0,5 %.

La membrane est incubée, 2h à température ambiante ou 1 nuit à 4°C, avec l'anticorps monoclonal AD46 au 1/2000ème final dans un tampon d'incubation (15 mM Tris pH 8,0, 150 mM NaCl, 0,1 % de Tween-20 et 4 % de lait écrémé).

La membrane est lavée 3 fois pendant 10 minutes dans le tampon d'incubation exempt de lait.

La membrane est ensuite incubée, 1h à température ambiante, avec une immunoglobuline de chèvre anti-souris couplée à la peroxydase de raifort, à une dilution finale de 1/4000ème (v/v) dans du tampon d'incubation exempt de lait. La membrane est lavée 3 fois dans du tampon d'incubation et les polypeptides immunoréactifs sont révélés à l'aide du kit de chimioluminescence ECL (Pharmacia-Amersham) selon les instructions du fabricant.

Spectrométrie de masse

Après électrophorèse 2D, une coloration du gel est effectuée. Le gel est fixé durant 30 minutes dans une solution contenant 10 % acide acétique, 50 % éthanol puis coloré dans la même solution contenant 0,5 % de Bleu de Coomassie R250. La décoloration est réalisée dans une solution contenant 30 % éthanol et 5 % d'acide acétique jusqu'à obtention d'un fond clair. Les tâches reconnues par l'anticorps monoclonal AD46 sont découpés dans le gel et traité suivant le protocole décrit par Andersen et Mann en 2000. La spectrométrie de masse est réalisée au centre commun de spectrométrie de masse de l'université de Lille 1.

B. Résultats

Immunohistochimie et microscopie électronique

AD2 est un anticorps anti-tau dirigé contre un double site de phosphorylation sur la protéine tau, et qui sert de référence pour étudier la dégénérescence neurofibrillaire dans la MA (Figure 1: AD2, Alz). L'anticorps monoclonal AD46 détecte les neurones en dégénérescence neurofibrillaire du tissu cérébral d'un patient Alzheimer (Figure 1: AD46, Alz). Aucun marquage neuronal n'est observé dans le tissu cérébral d'un sujet témoin (Figure 1: AD2 et AD46, T). À l'échelle de la microscopie électronique, les neurones en dégénérescence

neurofibrillaire se caractérisent par une accumulation de filaments pathologiques. Ces filaments sont constitués de protéines tau agrégées et appelés PHF (pour Paired Helical Filament). Ils sont également détectés étroitement et spécifiquement par l'anticorps AD46 (Figure 2). L'anticorps AD46 réagit donc avec un ou plusieurs constituants essentiels des filaments pathologiques des neurones en dégénérescence neurofibrillaire (Figure 2).

Analyse biochimique des antigènes reconnus par l'anticorps monoclonal AD46

L'anticorps monoclonal AD46 détecte 3 bandes après immunoempreintes annotées A, B et C de masse moléculaire apparente de 55, 47 et 42 kDa (Figure 3A: couloir 1D). Après électrophorèse 2D, 4 spots majeurs sont marqués (Figure 3 : partie 2D). Un seul spot correspond à A, de point isoélectrique de 8,2. Deux spots sont visualisés pour B, de points isoélectriques 5,0 et 7,0. Un seul spot est visualisé pour C de point isoélectrique 5,8 (Figure 3 : partie 2D).

Caractérisation des antigènes reconnus par AD46

Chaque protéine reconnue par AD46 a été isolée par électrophorèse 2D. Une digestion enzymatique par la trypsine a été réalisée dans le gel et les fragments peptidiques récupérés ont été analysés par spectrométrie de masse. L'identification est résumée dans le tableau suivant.

Identité des protéines	Organisme	Ref.	MM/pI	MM/pI	Id.
			theo.	obs.	
C: Actine cytoplasmique	Humain	P02570	41.6/5.29	42/5.5	MPF/WB
B: γ -énolase (EC 4.2.1.11)	Humain	P09104	47.1/4.94	47/5.0	MPF/WB
B: α -énolase (EC 4.2.1.11)	Humain	P06733	47.0/6.99	47/7.0	MPF
A: ATP synthase α -chaîne (EC	Humain	P25705	55.2/8.28	55/8.2	MPF/WB

3.6.1.34)

Id. : Identité des protéines confirmées par spectrométrie de masse (MPP) et immunoempreinte (WB). Ref. : référence des protéines suivant la nomenclature du site <http://www.expasy.ch/>.

Les masses moléculaires des fragments de chaque protéine sont utilisées pour interroger les banques de données de l'Internet:

(MS-FIT: <http://falcon.ludwig.ucl.ac.uk/ucsfhtml3.2/msfit.htm>)

Les résultats d'identification ainsi que le score d'identification sont résumés dans le tableau (Figure 4). Ainsi, la protéine A correspond à la chaîne α de l'ATP synthase, les protéines B sont respectivement la gamma énolase et l'alpha énolase et, la protéine C correspond à l'actine cytoplasmique. Il n'existe pas de similarité de séquence entre ces protéines. Notons cependant que l'anticorps monoclonal AD46 présente la plus forte affinité pour la protéine de 55 kDa, la chaîne α de l'ATP synthase.

Validation de la caractérisation de la protéine de 55 kDa en tant que chaîne α de l'ATP synthase

Un anticorps polyclonal dirigé contre la chaîne α de l'ATP synthase a été utilisé après électrophorèse 2D (Figure 5: Polyclonal). La chaîne α de l'ATP synthase est détectée à une masse moléculaire (MM) apparente de 55 kDa et un point isoélectrique de 8,2. L'anticorps AD46 reconnaît également la même protéine ; il s'agit bien de la chaîne α de l'ATP synthase (Figure 5: AD46).

Changement de solubilité de la chaîne α de l'ATP synthase dans la MA

Les protéines du tissu cérébral ont été dissociées suivant un gradient de solubilité croissant (cf. matériel et méthodes). Les protéines les plus solubles sont dans la fraction Tris

(Figure 6: 2e couloir des immuno-empreintes) et les protéines de moins en moins solubles sont récupérées à l'aide de détergent comme le Triton X-100 (3e et 4e couloir des immuno-empreintes (Figure 6). Les protéines B et C ne sont pas modifiées dans la MA (immuno-empreintes Témoin, Alzheimer infraclinique, Alzheimer confirmé, Flèches B et C). À l'inverse, la protéine A disparaît de la fraction 0,5 % Triton X-100 au stade infraclinique de la MA et dans les fractions 0,5 % et 2% Triton-X100 chez des Alzheimer confirmés (immuno-empreintes Alzheimer infraclinique et Alzheimer confirmé, flèche A) (Figure 6). Il y a donc une perte précoce de la solubilité de la chaîne α de l'ATP synthase dans la MA.

Confirmation de la disparition et du changement de solubilité de la chaîne α de l'ATP synthase dans la MA

Suivant la même méthodologie que sur la figure 6, la chaîne α de l'ATP synthase est détectée à l'aide d'un anticorps polyclonal dirigé contre la chaîne α de l'ATP synthase (figure 7 : indiquée par une flèche : A (55 kDa)). Dans les homogénats totaux de tissu cérébral d'un sujet témoin et d'un patient Alzheimer, la chaîne α de l'ATP synthase est détectée à 55 kDa de masse moléculaire apparente. Elle est totalement absente dans les fractions protéiques Tris et SDS 2 %. Elle est détectée dans les fractions 0,5 et 2 % Triton et dans la fraction SDS 0,1 % mais pas dans la fraction SDS 1 %, du sujet témoin. Dans les fractions protéiques du patient Alzheimer, elle est absente la fraction 0,5 % Triton, faiblement détectée dans la fraction 2 % Triton, et détectée dans les fractions 0,1 et 1 % SDS. En conclusion, il y a une diminution de la quantité et une insolubilisation de la chaîne α de l'ATP synthase dans la MA.

Association des modifications des propriétés biochimiques de

la chaîne α de l'ATP synthase avec le processus de dégénérescence neurofibrillaire

Ces changements de propriétés biochimiques sont associés au processus de dégénérescence neurofibrillaire de la MA. En effet, un co-marquage avec l'anticorps monoclonal AD2 a été réalisé sur la même expérience. Les protéines tau pathologiques (Figure 7: notées Tau 60, 64, 69) sont détectées uniquement dans les fractions du patient Alzheimer et pas du tout dans les fractions du sujet témoin (Figure 7). Notons qu'en dehors de l'homogénat total, la fraction protéique qui contient la plus grande quantité de protéine tau pathologiques correspond à la fraction 1% SDS (Figure 7). Cette fraction correspond également à celle où la chaîne α de l'ATP synthase est retrouvée dans la MA et pas chez le témoin. Il existe donc une relation entre le changement de solubilité de la chaîne α de l'ATP synthase et la présence de protéines tau pathologiques qui sont la signature biochimique de la dégénérescence neurofibrillaire dans la MA.

Copurification de la chaîne α de l'ATP synthase avec les agrégats de protéines tau et co-immunoprécipitation des protéines agrégées avec la chaîne α de l'ATP synthase

Les protéines tau agrégées sont purifiées dans la fraction sarcosyl insoluble et pas du tout les protéines tau de l'individu témoin (Figure 8A: Fraction 100K P, Témoin et Alz). L'anticorps polyclonal dirigé contre la chaîne α de l'ATP synthase détecte la chaîne α de l'ATP synthase dans la fraction sarcosyl insoluble du patient Alzheimer uniquement (Figure 8A: Fraction 100K P, marquage polyclonal anti-chaîne α de l'ATP synthase). Ce résultat démontre la copurification de la chaîne α de l'ATP synthase avec les agrégats de protéines tau des neurones en dégénérescence neurofibrillaire et donc

l'association direct de la chaîne α de l'ATP synthase dans le processus agrégatif des protéines tau.

Ce résultat est conforté par les expériences d'immunoprécipitation (Figure 8B). L'immunoprécipitation de la chaîne α de l'ATP synthase à l'aide de l'anticorps AD46 ou du polyclonal anti-chaîne α de l'ATP synthase révèle la présence de protéines tau hyperphosphorylées, qui sont mises en évidence par un marquage avec l'anticorps monoclonal AD2 ou un polyclonal dirigé contre la région carboxy-terminale de la protéine tau (Figure 8B: les deux couloirs Alz). Notons que les protéines tau du tissu cérébral d'un individu témoin ne sont pas visualisées suivant la même procédure expérimentale (Figure 8B: les deux couloirs Témoins). Cela démontre la spécificité de l'association de la chaîne α de l'ATP synthase aux protéines anormalement phosphorylées, constituant de base des agrégats, et pas du tout avec les protéines tau normales. L'association de la chaîne α de l'ATP synthase avec les protéines tau agrégées est donc à relier directement au processus physiopathologique et non une affinité intrinsèque de la chaîne α de l'ATP synthase pour les protéines tau.

Confirmation de l'implication de la chaîne α de l'ATP synthase dans le processus de dégénérescence neurofibrillaire dans la MA

Les neurones en dégénérescence neurofibrillaire sont détectés par les anticorps monoclonaux AD2 et AD46 sur du tissu cérébral de patient MA. Le tissu cérébral humain normal n'est pas marqué par l'anticorps AD46. Un anticorps polyclonal dirigé contre la chaîne α de l'ATP synthase détecte les neurones en dégénérescence neurofibrillaire du tissu cérébral de patient MA (Figure 9). À l'inverse, des anticorps dirigés contre les énolases ou l'actine cytoplasmique ne permettent

pas une détection sélective des neurones en dégénérescence neurofibrillaire dans la MA.

Les résultats ci-dessus montrent l'existence d'une accumulation spécifique de la chaîne α de l'ATP synthase, associée à des changements précoces des propriétés biochimiques de cette protéine dans la maladie d'Alzheimer est ici démontrée. La chaîne α de l'ATP synthase est donc directement impliquée dans le processus de dégénérescence neurofibrillaire dans la MA, et elle constitue de ce fait une nouvelle cible diagnostique et thérapeutique.

Exemple 2 : détection de la dégénérescence neurofibrillaire

I. La détection de la dégénérescence neurofibrillaire est effectuée à l'aide d'anticorps dirigés contre la chaîne alpha de l'ATP-synthase et par immunomarquage avec des anticorps dirigés contre d'autres protéines du complexe V de la mitochondrie.

Des coupes séries du cortex temporal d'un patient atteint de la maladie d'Alzheimer ont été utilisées pour réaliser l'analyse immunohistochimique. Les neurones en dégénérescence neurofibrillaire sont indiqués par des flèches.

La figure 10 présente les expériences suivantes :

(A) Détection de la dégénérescence neurofibrillaire à l'aide de l'anticorps monoclonal AD2, dirigé contre les protéines tau phosphorylées.

Chaîne alpha de l'ATP synthase:

(B) Détection de la dégénérescence neurofibrillaire à l'aide de l'anticorps monoclonal AD46.

(C) Détection de la dégénérescence neurofibrillaire à l'aide d'un anticorps polyclonal dirigé contre la partie amino-terminale de la chaîne alpha de l'ATP synthase. L'anticorps polyclonal utilisé a été préparé à partir du peptide suivant (SEQ ID N°1) correspondant à la région amino-terminale de la chaîne alpha de l'ATP synthase qui débute à l'acide aminé 45 et se termine à l'acide aminé 58 : CKTGTAEMSSILEER

(D) Détection de la dégénérescence neurofibrillaire à l'aide d'un anticorps polyclonal dirigé contre la partie carboxy-terminale de la chaîne alpha de l'ATP synthase. L'anticorps polyclonal utilisé a été préparé à partir du peptide suivant (SEQ ID N°2) correspondant à la région carboxy-terminale de la chaîne alpha de l'ATP synthase qui débute à l'acide aminé 540 et se termine au dernier acide aminé 553 : CLKEIVTNFLAGFEA

Les peptides des expériences C et D ont été synthétisés par la société Neosystem (Strasbourg, France) et additionnés d'une cystéine (C) à leur extrémité amino-terminale pour permettre le couplage au carrier qui est l'ovalbumine. Les anticorps polyclonaux ont ensuite été réalisés par la société Neosystem, chez le lapin.

Autres protéines du complexe V de la mitochondrie:

(E) Immunomarquage réalisé à l'aide d'un anticorps monoclonal dirigé contre la chaîne bêta de l'ATP synthase.

(F) Immunomarquage réalisé à l'aide d'un anticorps monoclonal dirigé contre l'OSCP (Oligomycin Sensitivity-Conferring Protein).

Les anticorps monoclonaux des expériences E et F ont été obtenus de la société Molecular Probes (Leiden, Netherlands).

Résultats :

Cette figure montre la spécificité de l'association de la chaîne alpha de l'ATP synthase avec le processus de dégénérescence neurofibrillaire.

En effet, deux anticorps polyclonaux dirigés contre l'extrémité amino- et l'extrémité carboxy-terminale de la chaîne alpha de l'ATP synthase ont été réalisés. Ces deux anticorps marquent les neurones en dégénérescence neurofibrillaire (DNF) dans le tissu cérébral d'un patient atteint de la maladie d'Alzheimer. Le marquage est tout à fait superposable à celui obtenu avec l'anticorps AD46 décrit dans l'exemple 1.

A l'inverse, l'utilisation d'anticorps monoclonaux dirigés contre d'autres protéines du complexe V de la mitochondrie, complexe auquel la chaîne alpha appartient également, ne marquent pas les neurones en DNF. Ce résultat montre donc la spécificité de l'association de la chaîne alpha de l'ATP synthase au processus de DNF dans la maladie d'Alzheimer.

II. La détection de la dégénérescence neurofibrillaire a également été réalisée à l'aide d'un anticorps anti-chaîne alpha de l'ATP synthase commercialisé. Par ailleurs, les anticorps selon l'invention ont été testé afin de mettre en évidence leur capacité à détecter la dégénérescence neurofibrillaire dans d'autres maladies neurodégénératives.

La figure 11 présente les expériences suivantes :

Chaîne alpha de l'ATP synthase:

(A) Détection de la dégénérescence neurofibrillaire à l'aide d'un anticorps monoclonal dirigé contre la chaîne alpha de l'ATP synthase (Molecular Probes, Leiden, Netherlands).

Autres maladies neurodégénératives:

(B) Détection de la dégénérescence neurofibrillaire dans le cortex frontal d'un patient atteint de la maladie de Pick à l'aide de l'anticorps monoclonal AD46. Les corps de Pick qui sont les structures neuropathologiques intraneuronales caractéristiques de cette pathologie sont indiqués par des flèches.

(C) Détection de la dégénérescence neurofibrillaire dans le cortex frontal d'un patient atteint du syndrome de Down (Trisomie 21) à l'aide de l'anticorps monoclonal AD46. Les neurones en dégénérescence neurofibrillaire sont indiqués par des flèches.

Résultat :

Cette dernière figure montre que l'anticorps monoclonal AD46 détecte également les neurones en DNF d'autres maladies neurodégénératives. La maladie de Pick et la Trisomie 21 est montrée en exemple. La chaîne alpha de l'ATP synthase est donc également impliqué dans le processus de DNF du à d'autres maladie neurodégénératives.

Exemple 3 : Méthode de préparation d'outils immunologiques contre la chaîne alpha de l'ATP synthase pathologique, en particulier contre les épitopes pathologiques.

La méthode peut comporter les étapes suivantes :

- Extraction sélective de la dégénérescence neurofibrillaire à partir de tissu humain affecté par le processus dégénératif de type Alzheimer, en utilisant des tampons de solubilisation de plus en plus puissant (tris, triton, SDS, sarkosyl, acide formique).
- Extraction de la chaîne alpha de l'ATP synthase pathologique liée aux protéines tau de la dégénérescence neurofibrillaire par une approche immunologique et biochimique (par exemple, immunoprecipitation de la chaîne alpha de l'ATP synthase pathologique par un anticorps polyclonal ou par AD46, puis purification de la chaîne alpha de l'ATP synthase pathologique du produit immunoprecipité par électrophorèse, HPLC, ou toute autre méthode appropriée)
- Utilisation de la chaîne alpha de l'ATP synthase pathologique purifiée comme antigène pour la production d'outils immunologiques polyclonaux ou monoclonaux. Utilisation de la molécule complète comme épitope ou digestion ménagée de la chaîne alpha l'ATP synthase pathologique purifiée, détermination de l'épitope pathologique par immunopurification à l'aide de l'anticorps AD46 et utilisation de l'épitope pour la production d'anticorps polyclonaux, ou monoclonaux.
- Pour la production d'anticorps monoclonaux, sélection des hybridomes obtenus pour les dosages spécifiques des épitopes normaux et pathologiques de la chaîne alpha de l'ATP synthase pathologique.

Idéalement, les clones retenus doivent posséder les propriétés immunologiques suivantes:

1. Détection des processus neurodégénératifs de type Alzheimer par immunohistochimie

2. Détection de la chaîne alpha de l'ATP synthase pathologique

3. Co-immunoprécipitation des protéines tau pathologiques

Références

Andersen JS, Mann M (2000) Functional genomics by mass spectrometry. *FEBS Letters* 480, 25-31.

Delacourte A, David JP, Sergeant N, Buee L, Wattez A, Vermersch P, et al. (1999) The biochemical pathway of neurofibrillary degeneration in aging and Alzheimer's disease. *Neurology*, 52, 1158-65.

Greenberg, S. G. and P. Davies (1990). "A preparation of Alzheimer paired helical filaments that displays distinct tau proteins by polyacrylamide gel electrophoresis." *Proc Natl Acad Sci U S A* 87(15): 5827-31.

Goedert, M., M. G. Spillantini, N. J. Cairns and R. A. Crowther (1992). "Tau proteins of Alzheimer paired helical filaments: abnormal phosphorylation of all six brain isoforms." *Neuron* 8(1): 159-68.

Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-5.

O'Farrell, PZ, Goodman HM, et al. (1977a). "High resolution two-dimensional electrophoresis of basic as well as acidic proteins." *Cell* 12(4), 1133-41.

O'Farrell, P. H. and P. Z. O'Farrell (1977b). "Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoretic fractionation." *Methods Cell Biol* 16, 407-20.

Permanne B, Buee L, David JP, Fallet-Bianco C, Di Menza C, Delacourte A (1995) Quantitation of Alzheimer's amyloid peptide and identification of related amyloid proteins by dot-blot immunoassay. *Brain Res*, 685, 154-62.

Reig S, Buee-Scherrer V, Mourton-Gilles C, Defossez A, Delacourte A, Beauvillain JC, et al. (1995) Immunogold labelling of paired helical filaments and amyloid fibrils by specific monoclonal and polyclonal antibodies. *Acta Neuropathol*, 90, 441-7.

Vincent, I. J. and P. Davies (1992). "A protein kinase associated with paired helical filaments in Alzheimer disease." Proc Natl Acad Sci U S A 89(7): 2878-82.

REVENDICATIONS

1. Marqueurs du processus neurodégénératif, constitués par la chaîne α de l'ATP synthase ayant subi des modifications pathologiques résultant dudit processus.
2. Marqueurs selon la revendication 1, caractérisés en ce que les modifications de la chaîne α de l'ATP synthase sont de type fonctionnelles, de localisation, structurelles et/ou antigéniques.
3. Marqueurs selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisés en ce que le processus neurodégénératif est celui de toute pathologie avec un processus de dégénérescence neurofibrillaire et d'agrégation de protéines tau, en particulier, celui de la maladie d'Alzheimer.
4. Marqueurs selon la revendication 3, caractérisés en ce que l'une des modifications fonctionnelles de la chaîne α de l'ATP synthase est son insolubilité.
5. Marqueurs selon la revendication 3 et/ou 4, caractérisés en ce que l'une des modifications de localisation de la chaîne α de l'ATP synthase est sa localisation dans le cytoplasme de la cellule.
6. Marqueurs selon la revendication 3, caractérisés en ce que l'une des modifications structurelles de la chaîne α de l'ATP synthase est la formation d'agrégats au niveau du cerveau.

7. Marqueurs selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisés en ce qu'ils interagissent avec les protéines tau.

8. Méthode de détection et/ou de diagnostic *in vitro* du processus neurodégénératif, caractérisée en ce qu'on détecte dans un échantillon à analyser un des marqueurs selon l'une des revendications 1 à 7.

9. Méthode selon la revendication 8, caractérisée en ce qu'elle comprend l'utilisation de jeux d'anticorps dirigés contre la protéine normale et/ou contre des modifications de la chaîne α de l'ATP synthase.

10. Méthode selon l'une quelconque des revendications 8 ou 9, caractérisée en ce qu'elle est appliquée à la détection du processus dégénératif de toute pathologie avec un processus de dégénérescence neurofibrillaire et d'agrégation de protéines tau, en particulier celui de la maladie d'Alzheimer.

11. Méthode selon l'une quelconque des revendications 8 à 10, caractérisée en ce qu'on utilise une détection immuno-chimique, en particulier par électrophorèse 1D et/ou 2D couplée à une immunoempreinte, révélation par des anticorps polyclonaux ou des anticorps monoclonaux dirigés contre la chaîne α de l'ATP synthase, immuno-essai et/ou radioimmuno-essai, éventuellement complétée par une analyse de spectrométrie de masse.

12. Méthode selon l'une quelconque des revendications 8 à 11, caractérisée en ce que les échantillons à analyser utilisés dans ladite méthode comprennent des tissus ou des cellules neuronales, des tissus ou des cellules non neuronales, en particulier des liquides biologiques, de préférence le sang.

13. Méthode de diagnostic selon l'une quelconque des revendications 8 à 12, caractérisée en ce qu'on évalue en outre le degré de la pathologie en établissant un indice basé sur le rapport entre le taux normal de chaînes α de l'ATP synthase chez des témoins dans une fraction protéique définie, par rapport au taux observé au stade avancé de la maladie d'Alzheimer.

14. Méthode de diagnostic selon l'une quelconque des revendications 8 à 13, caractérisée en ce qu'on évalue en outre le degré de la pathologie en établissant un indice basé sur les modifications de la chaîne α de l'ATP synthase chez un patient par rapport à un témoin.

15. Applications de la méthode selon les revendications 8 à 14, pour l'aide au diagnostic *ante et post-mortem* des maladies neurodégénératives, en particulier la maladie d'Alzheimer, du stade infraclinique au stade clinique.

16. Modèle animal ou cellulaire, caractérisé en ce qu'il exprime une chaîne α de l'ATP synthase présentant un défaut de signal de maturation et/ou une anomalie de modification post-traductionnelle.

17. Application de la méthode selon l'une quelconque des revendications 8 à 14 ou du modèle selon la revendication 16, pour le criblage pharmacologique et les essais thérapeutiques de molécules efficaces contre les pathologies neurodégénératives, en particulier de type Alzheimer.

18. Application de la méthode selon l'une quelconque des revendications 8 à 14, pour établir et valider des modèles

cellulaires et/ou des modèles animaux de pathologies neurodégénératives, en particulier de la maladie d'Alzheimer.

19. Utilisation d'un kit de détection de la chaîne α de l'ATP synthase, pour le diagnostic de maladie neurodégénératives, en particulier pour la détection de la maladie d'Alzheimer.

20. Anticorps polyclonaux et/ou monoclonaux dirigés contre des motifs de conformation pathologique de la chaîne α de l'ATP synthase résultant d'un processus neurodégénératif.

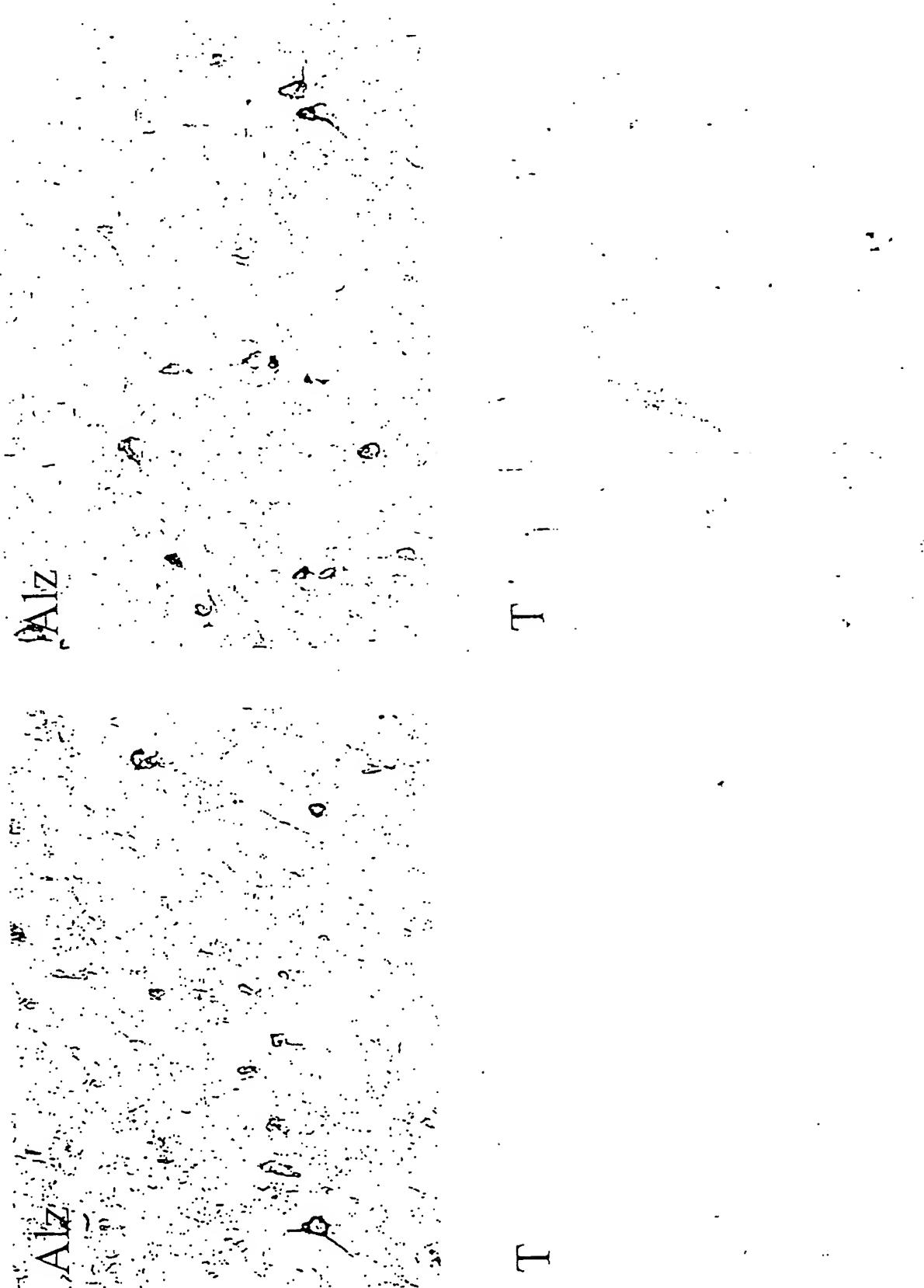
21. Kit de diagnostic caractérisé en ce qu'il comprend des jeux d'anticorps selon la revendication 20.

22. Kit de diagnostic selon la revendication 21, caractérisé en ce que ledit kit renferme des réactifs permettant la réalisation d'un dosage immunochimique, en particulier de type ELISA, immuno-empreintes, Western blots, dots-blots, radioimmuno-essai ou immuno-essai.

AD46

AD2

Figure 1



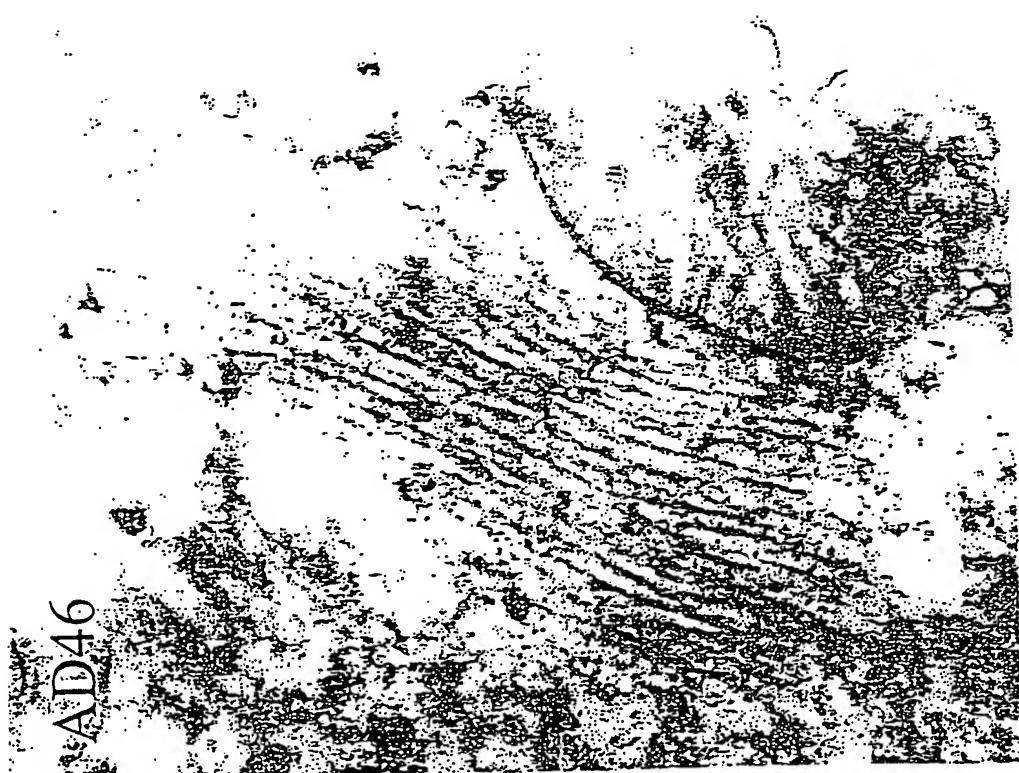
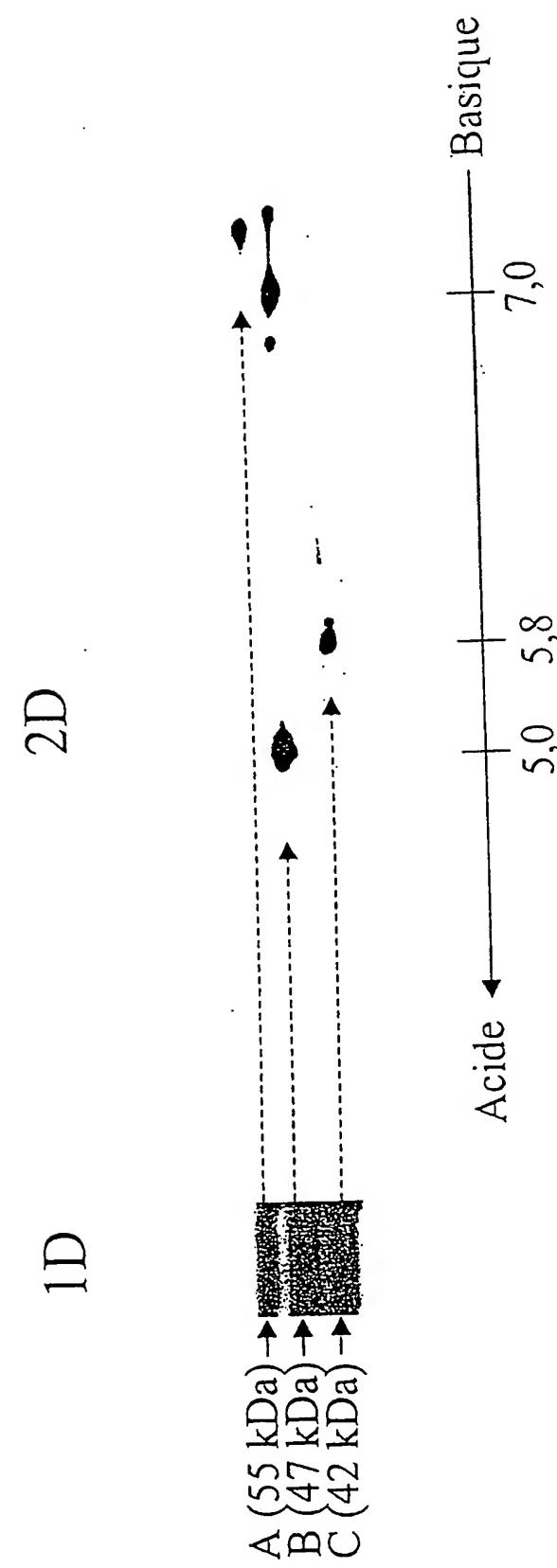


Figure 2

FEUILLE DE REMplacement (REGLE 26)

Figure 3



FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

<u>MM des fragments de la protéine A</u>					
815,459	892,494	1026,589	1149,614	1287,703	1438,872
1553,783	1551,829	1624,923	1667,8	1683,797	1927,327
					2120,029
Score d'identification	376				
% de fragments identifiés	75				
Espèce	humain				
Numéro d'identification	P06576				
Nom	ATP synthase chaîne alpha (EC 3.6.1.34)				
<u>MM des fragments de la protéine B</u>					
848,299	880,299	1160,199	1570,499	1583,499	1805,199
1938,899	2366,499	2482,199	2578,699	2702	1858,899
Score d'identification	164,3				
% de fragments identifiés	60				
Espèce	humain				
Numéro d'identification	P09104				
Nom	Enolase gamma (EC 4.2.1.11)				
<u>MM des fragments de la protéine C</u>					
794,899	945,199	975,999	1132,299	1198,499	1516,099
1953,299	2214,599				1790,699
Score d'identification	178,5				
% de fragments identifiés	100				
Espèce	humain				
Numéro d'identification	P15475				
Nom	Actine cytoplasmique				

Figure 4

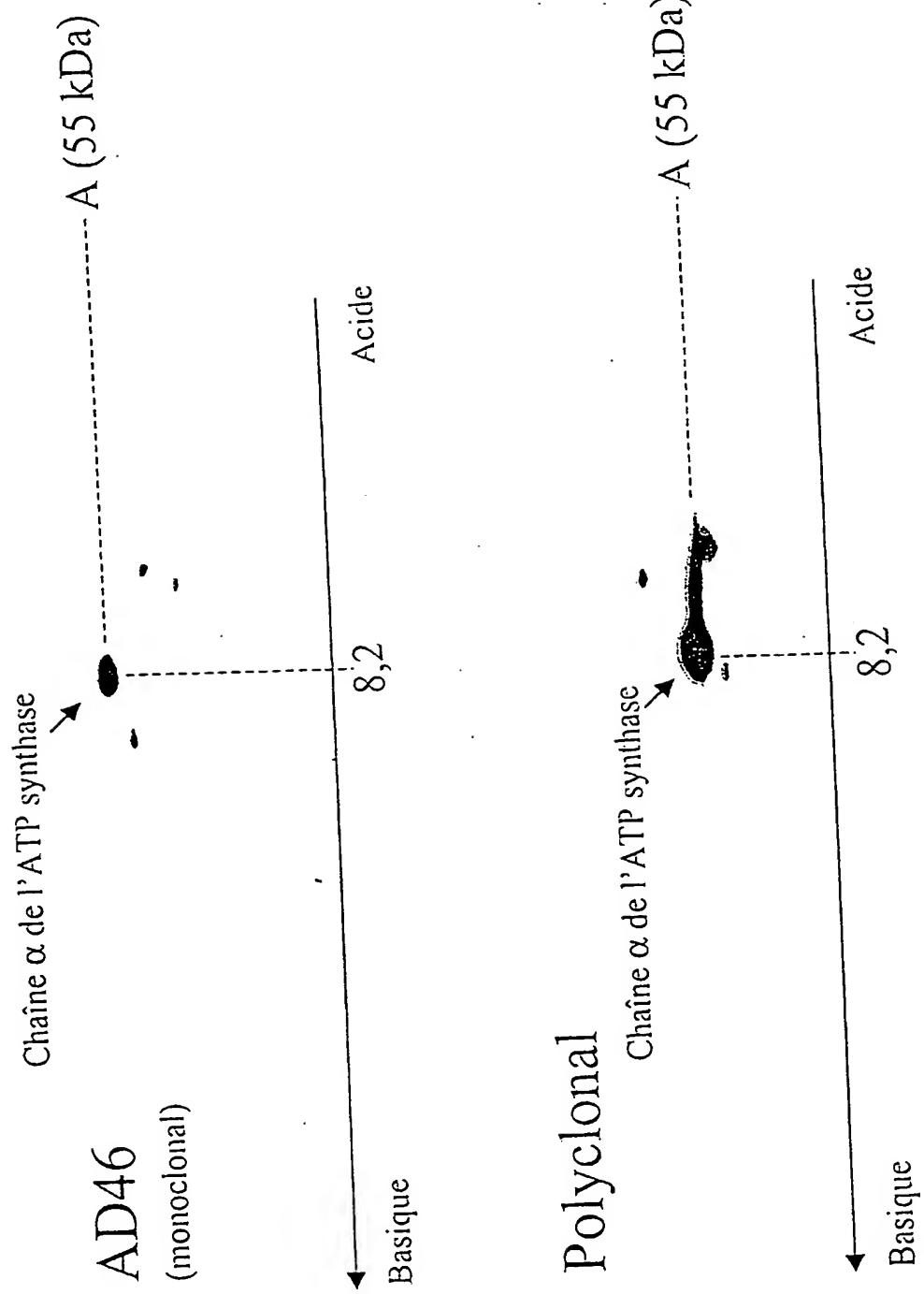
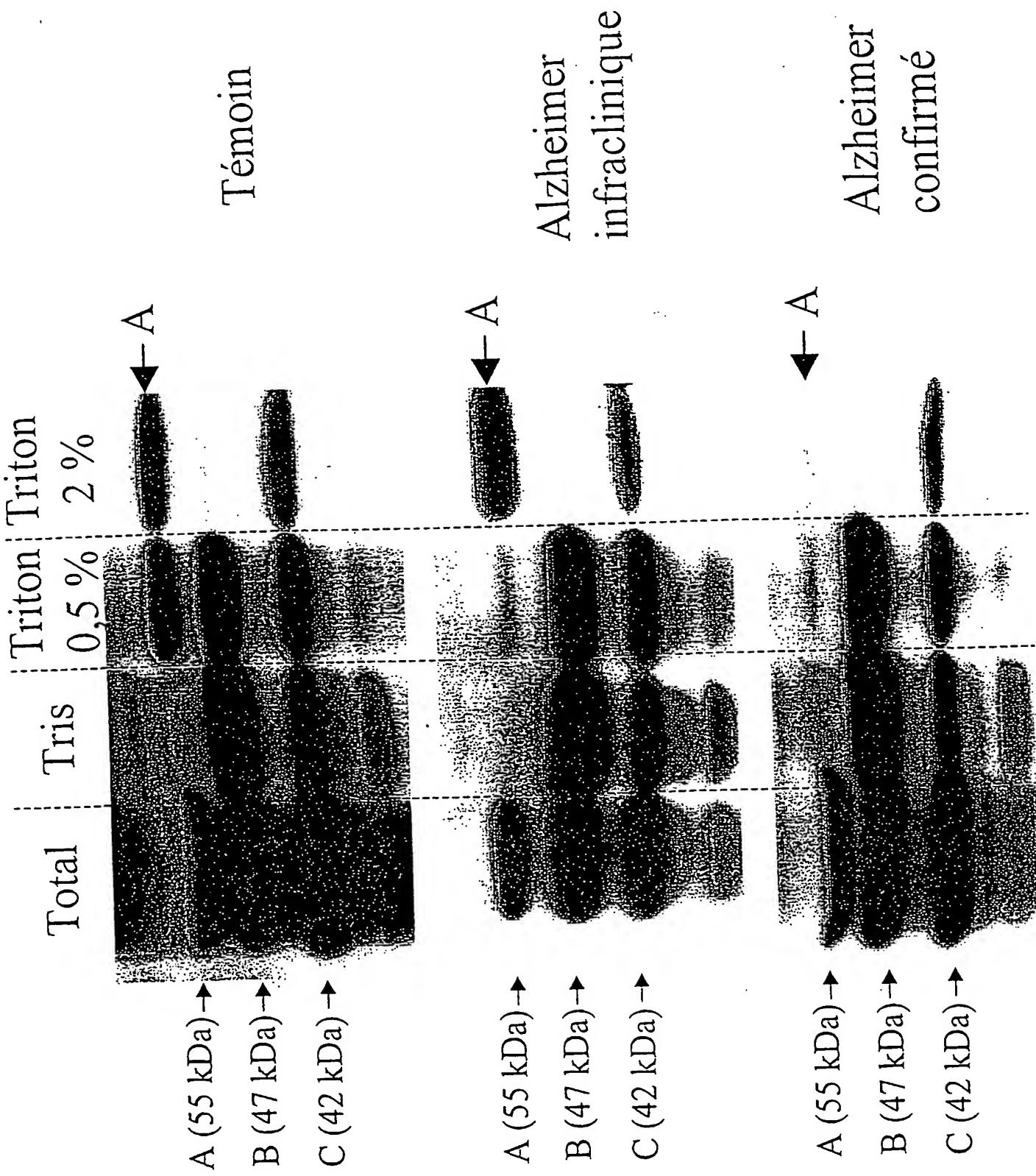


Figure 5

Figure 6
FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)



FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

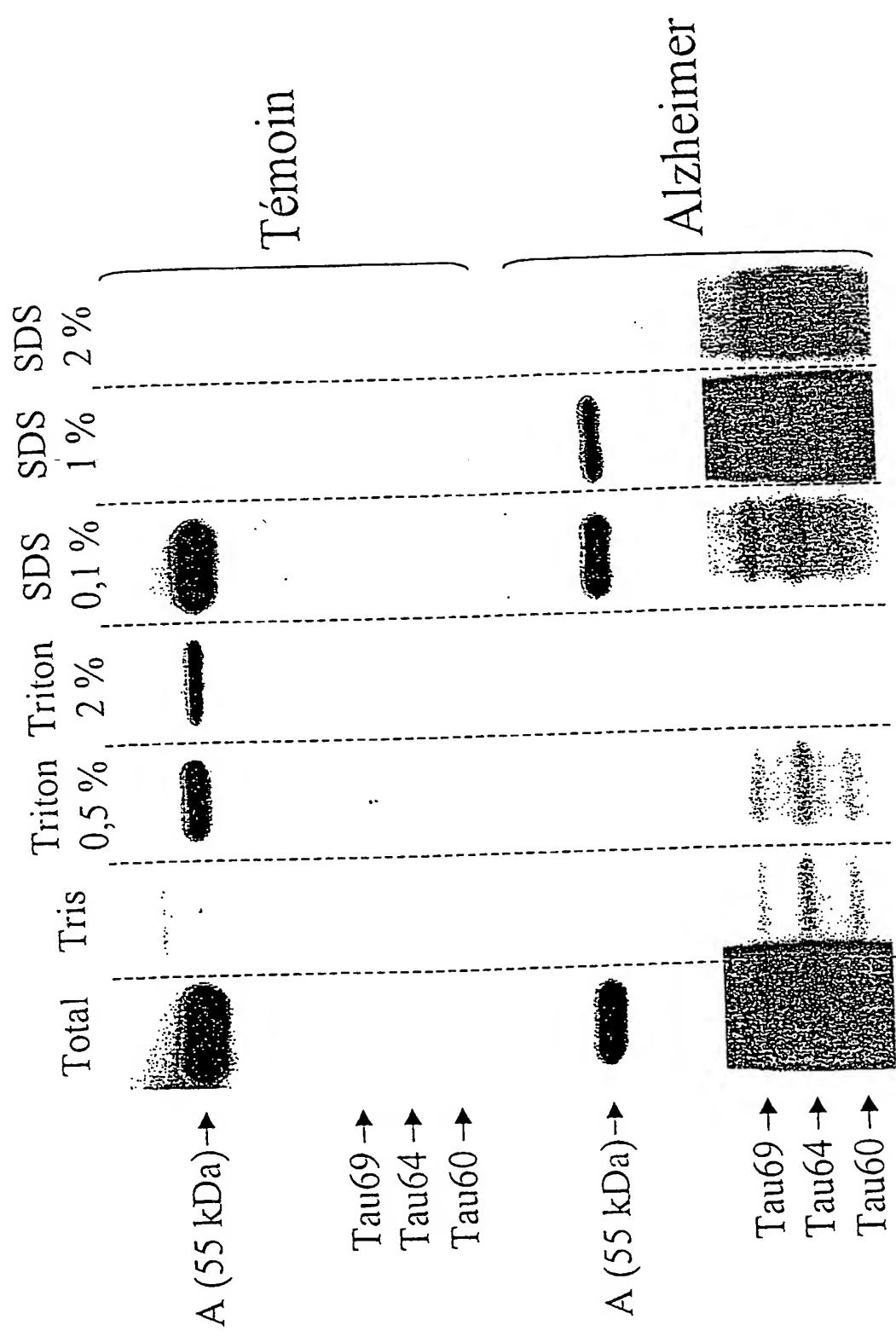
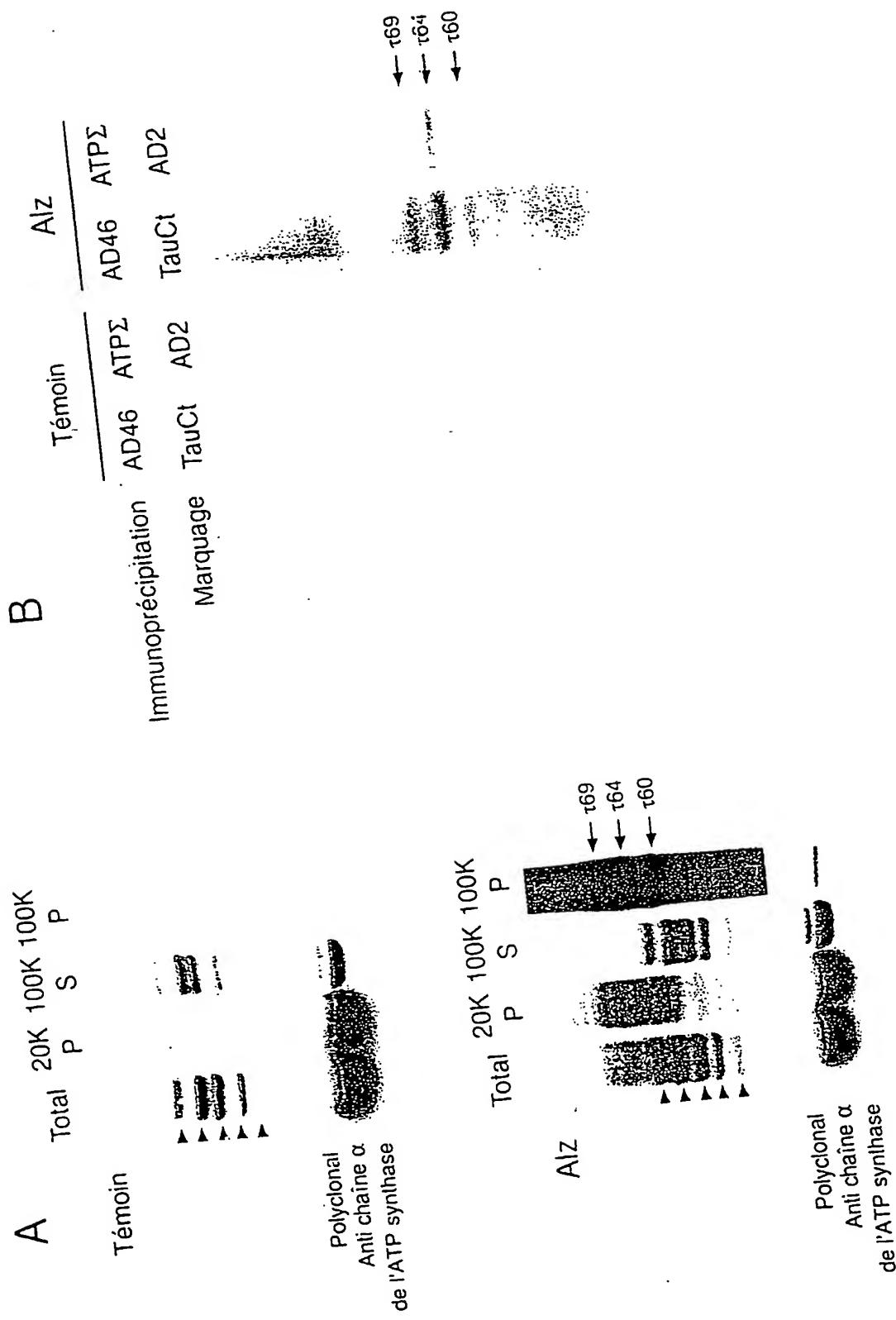


Figure 7

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

Figure 8



FEUILLE DE REMplacement (REGLE 26)

Figure 9

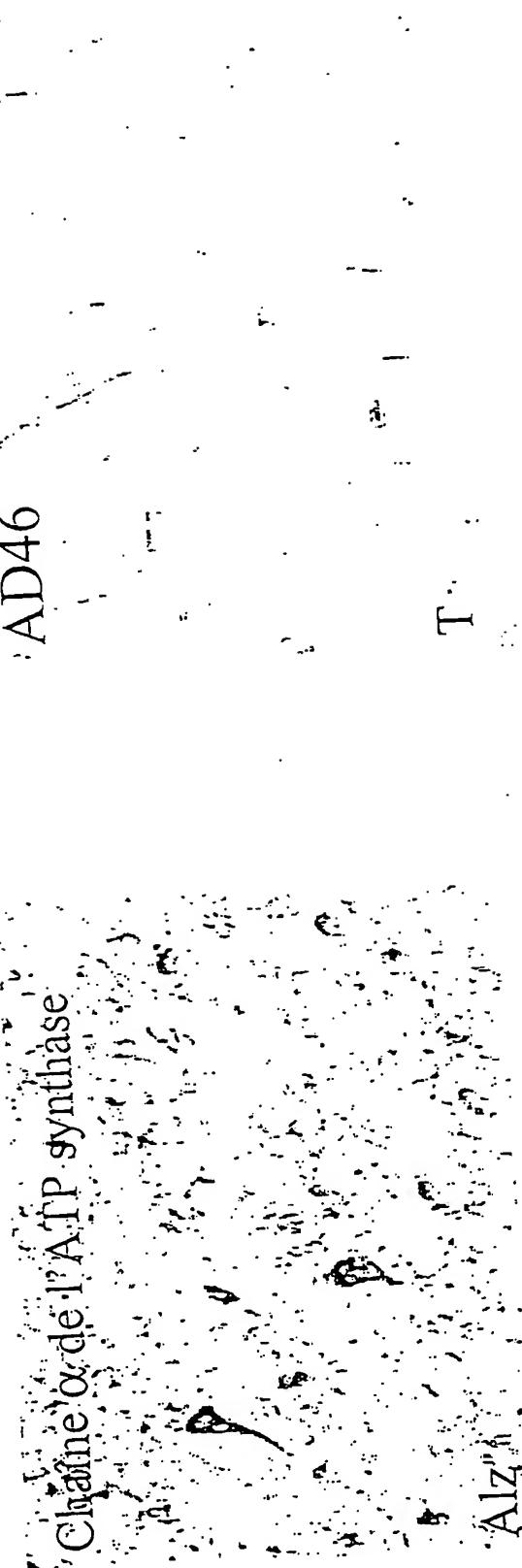
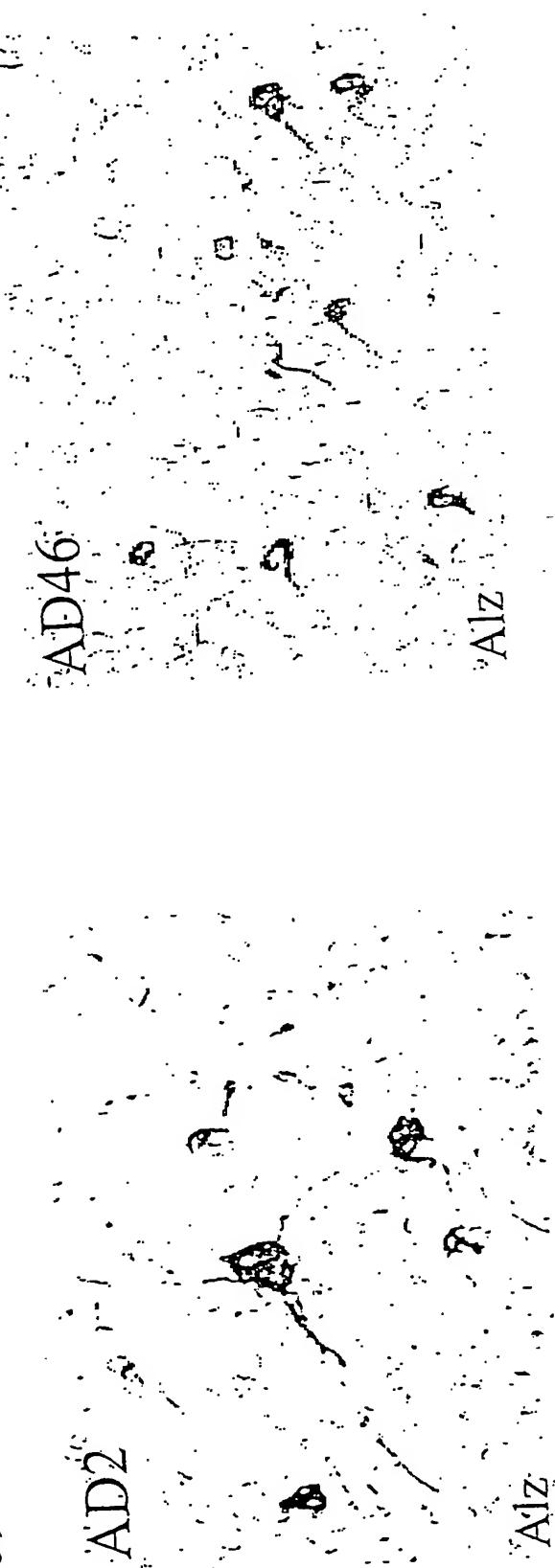


Figure 10:

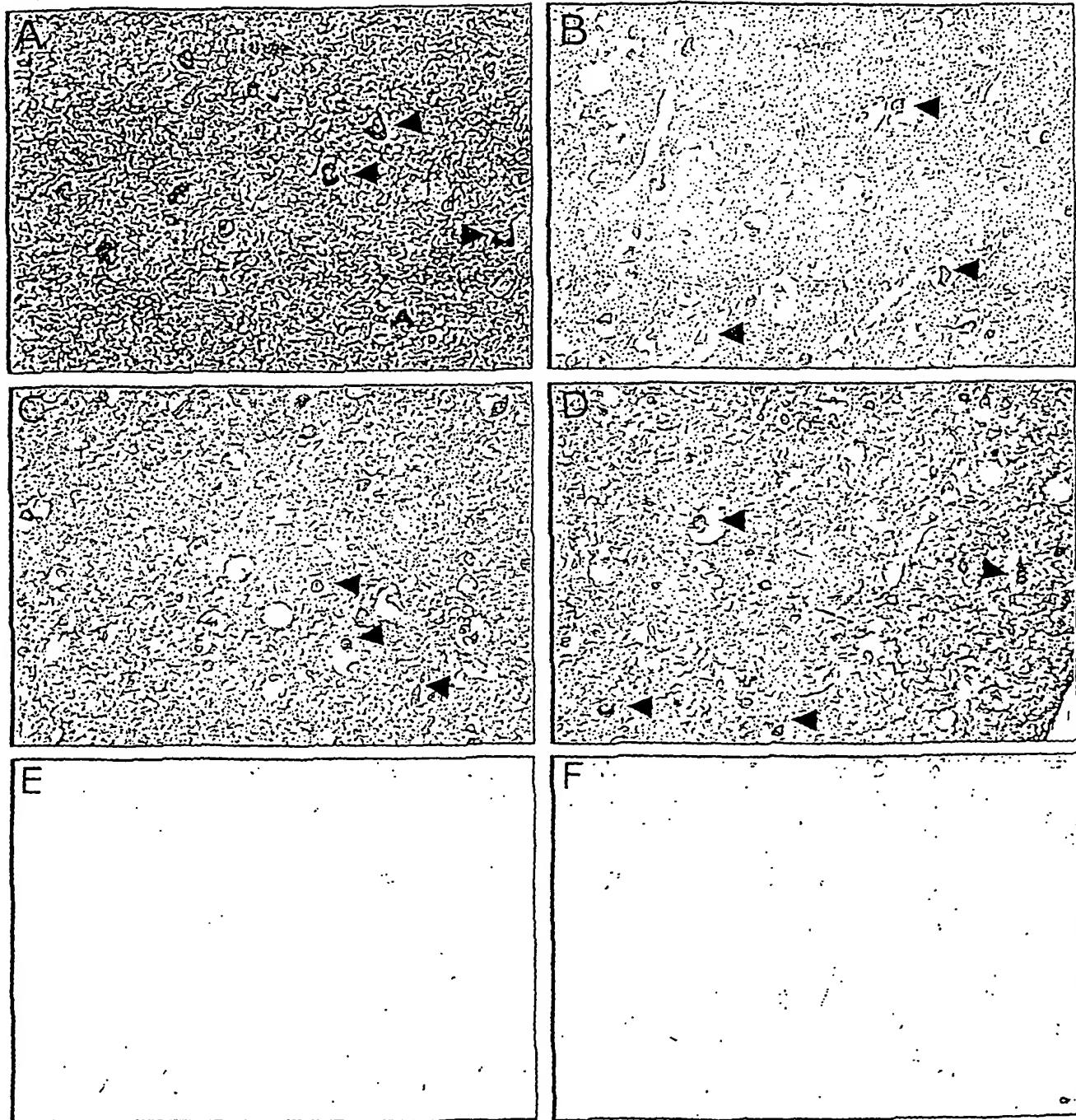
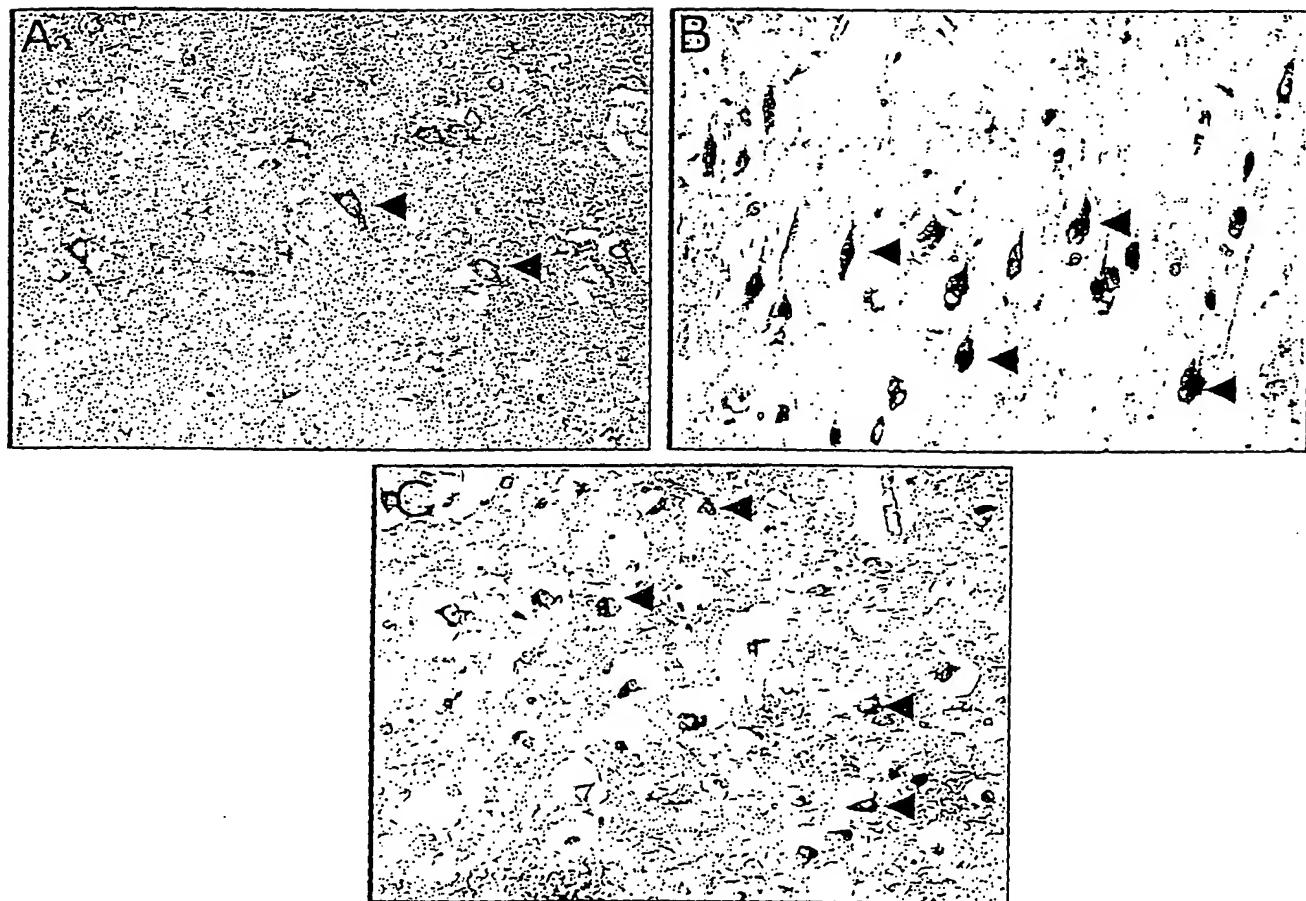


Figure 11:



FEUILLE DE REMplacement (REGLE 26)